



TITLE:

<研究報告>ツベルクリン特にその
製法の再検討(〔第7部〕細菌血清
學部)

AUTHOR(S):

白石, 正雄

CITATION:

白石, 正雄. <研究報告>ツベルクリン特にその製法の再検討(〔第7部〕
細菌血清學部). 京都大學結核研究所年報 1950, 1: 168-174

ISSUE DATE:

1950-03-31

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/50957>

RIGHT:

験管からは継代増殖せしめ得たが、より高濃度の試験管よりは証明できなかつた。

以上により抽出物に於ても低濃度では發育抑制的に、高濃度では殺菌的に作用する事が分つた。

〔尙本報の要旨は22回日本細菌學會總會及びペニシリン學術協議會に於て発表した。詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。〕

(第6報) 抽出物の精製。

Streptomycin の精製方法に準じて本抗菌物質の精製を試みた。

先づ抽出物(粗製塩酸塩)を90%「メタノール」に溶解し、苛性曹達で pH6.3 となし、生じた沈澱と上清とを別け各々の抗菌力を測定した。その結果、兩者共、略々同等の抗菌力を有して居た。そこで上清と沈澱(90%メタノールに溶解)とを別々にクロマトグラフ法で精製した。展開には80%「メタノール」次で水を以てした。アルミナは Streptomycin の場合と同様に稀硫酸に浸漬し、水洗、乾燥後使用した。その結果、Streptomycin の場合とは反対に「メタノール」展開の分層には殆んど抗菌力を有せず、水で展開した分層に抗菌力を有して居た。然し、原液の抗菌力に比しては極めて微弱で恐らく大部分の抗菌物質は「アルミナ」に吸着されたまま残存して居るものと思考された。この抗菌力ある分層をまとめて、減圧濃縮後、メタノールを以て再結晶を行ひ、白色の結晶を得た。このものはブドウ球菌、大腸菌に対し抗菌力を有して居た。

次にアルミナは稀硫酸に浸漬する事なく、その儘詰め、抽出物は苛性曹達を用ひず、90%「メタノール」に溶解したのみで、クロマトグラフ法による精製を行つて見た。その結果、抗菌物質は殆んど完全にメタノール分層中に集められるが、この分層中には色素を含有して居た。

以上の成績に基き、目下更に精製法の改良を検討中である。

〔尙本報の詳細は雑誌「ペニシリンその他抗生物質」に掲載の予定。〕

ツベルクリン特にその製法の再検討

白 石 正 雄

緒 言

現在われわれが使用しているツベルクリン(以下「ツ」と略す)は非常に種類が多く、大部分は旧^{1) 2)}國際聯盟法に随つて標準「ツ」に力價をあわせたものであるが、實際人体について比較してみると、³⁾力價に非常な懸隔を認める。^{4) 5)} 場合用いた力價檢定法の適否如何によつて、力價の変動を招來するではあるが、特に「ツ」及びその製法の再吟味がまず問題となつてくる。即ちできる丈け精製せられた特異性の高い製品が望ましい。その代表的なものとして、すでに Maschmann und Küster のカオリン吸着法による精製「ツ」⁶⁾、Boquet et Sandor の燐タングステン酸「ツ」⁷⁾があり、Seibert の PPD はひろく使用されている。⁸⁾ 最近 Corper 等は Autolytic Tuberculin が「ツ」蛋白を多量に含有するといふ。^{9) 10)} 元來コッホの旧「ツ」はグリセリンブイヨンに人型菌或いは牛型菌を6~8週又は7~10週或いは菌膜が液面をおうて、大体沈下しはじめる頃まで培養し、菌体とともに濃縮して1/10量にしたものである。^{3) 11)} しかし、グリセリンブイヨンの組成成分である肉エキス、ペプトンがすでに規格のき

わめて不定なものであり、夾雑分が多く、加うるに培養日数をきわめて幅廣くとすることは、培養菌株によつては、力價の変動を醸す第一歩になるのではあるまいか。更に「ツ」の充分產生せられた時期をもつと正確に知る方法はないであらうか。殊に「ツ」の製法に関する文献は内外ともにまことに寥々たるものであつて、僅かに戸田教授等の報告をみるにすぎない。これに鑑みて著者は「ツ」作製時の菌株、培養時期、製法、検定法、致死因子及び皮膚因子等に関して再検討する必要を痛感し、次の実験を行つた。

実験方法。

(I) 使用菌株。

1. 朝倉株：昭和18年6月著者が肺結核患者喀痰より4%苛性ソーダ法にて分離した。4%グリセリン加及び不加ペトラニヤー培地上にて優性發育、グリセリン嗜好性、家兎靜脈内法にて強毒人型菌であつた。
 2. フランクフルト株（以下F株と略す）：当研究室保存の人型菌株であつて、昭和18年3月ペトラニヤー培地培養にて中等毒力の菌株であつた。
 3. 中村株：昭和19年肺結核患者喀痰より上坂友田培地に分離、培養上人型菌であつた。
 4. B. C. G.：傳研株であつて、ソートン馬鈴薯培地に良好な發育をする。
- B. C. G. 以外の各菌株は昭和19年以來上坂友田培地に継代している。その後青山B株をも追加した。

(I) ツベルクリンの製法。

上記各株を4%グリセリンブイヨン或いはソートン培地（B. C. G以外は pH 6.8, B. C. Gは pH 7.2に修正）上に植菌し、37°Cに5~8週間培養したのち、100°C 30分乃至1時間加熱、菌体を滅菌硬質濾紙にて濾別し、濾液を3分してF₁、F₂、F₃とした。F₁を非濃縮「ツ」とし、F₂を70°~80°C水浴上にて蒸発濃縮又は104°Cにて蒸溜濃縮して「ツ」Aとし、蒸溜分をD₂とする。F₃に菌体を混和磨碎し、その遠心上清を $\frac{3}{4}$ ~ $\frac{1}{4}$ 量に濃縮し、濾液F₃に濾過残渣及び遠心沈渣の蒸溜水洗滌液を加えて1/10量に濃縮し「ツ」Bとし、蒸溜分をD₃、D₃'とす。各「ツ」に0.5%の割合に石炭酸を加えて保存した。

(II) ツベルクリン反應。

各「ツ」を所要濃度に0.5%石炭酸食塩水にて稀釈して、その0.1ccをF株1mg皮下接種モルモット皮内に注射した。皮内発赤反應は24時間値、48時間値の短径、長径の平均値をもつてあらわした。致死反應には、F株感染後1月のモルモットに「ツ」を0.1~0.25cc皮下注射し、1時間以内に死ななかつたことをたしかめて、24時間以内の致死状況を觀察、直ちに剖檢した。

実験成績。

(I) 青山B株ソートン培養の發育菌重量、生菌數及び増殖の速さの推移。

發育菌重量として青山B株ソートン培地（200cc容エルレンマイヤコルベンに培地100ccづゝ分注）上に發育した生のまゝの全菌体をスパーテルにて滅菌濾紙上にとり、37°Cに2,3時間乾燥し、化学天秤にて秤量した。生菌數は、菌重量10,10mgの食塩水浮游液（0.1cc）を上坂友田培地10本宛に流してこんで37°C1月培養ののち、發生した集落數（平均値）をもつてあらわした。第1表のように、ソートン培養2,3週までは生菌數、菌重量ともに旺盛な増加をするが、3週以後生菌數は急に減弱してゆく。菌重量は菌膜の大部分の沈下とともに、若干減少するが、液面に残存した菌膜よりうすい再生菌膜が

ひろがつて、菌重量は一時的増加をみる。しかし6週以後13週まで漸次減少の一路を辿る。生菌の増殖の速さ（集落の平均初発日数）は4,5週までは略々一定しているが、5,6週以後急に衰える。菌の染色上の形態変化をみてゆくと均等にそまつていた菌体内に顆粒が連珠状にあらわれてくる。菌体の一部が融解してゆくものと考えられる。¹³⁾

第1表 (1) 青山B株ソートン培養における発育全菌量

2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10週	13週
0.9393 g	7.0739 g	5.9351 g	5.6767 g	5.4769 g	4.2731 g	3.6236 g	3.6236 g	3.4201 g

(2) 青山B株ソートン培養^{-4 -5 -6}10, 10, 10 mg 中の生菌数（平均集落数）

菌 量	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10週	13週
⁻⁴ M 10mg σ	166 \pm 6.95 32.7 \pm 4.92	315 \pm 1.377 64.7 \pm 9.71	87 \pm 13.66 64.2 \pm 14.29	23 \pm 3.45 16.23 \pm 2.44	5	7	1.3	0	0
⁻⁵ M 10mg σ	85 \pm 5.63 26.5 \pm 3.39	253 \pm 2.89 15.3 \pm 2.29	14 \pm 2.99 14.09 \pm 2.12	1.8	1	0	0	0	0
⁻⁶ M 10mg σ	17 \pm 1.83 8.59 \pm 1.29	1.5	3.5	0.3	0	0	0	0	0

M: 平均値 σ : 標準偏差

(3) 青山B株ソートン培養における増殖の速さ（集落初発日数）

培養菌量	2 週	3 週	4 週	5 週	6 週	7 週	8 週	10週	13週
⁻⁴ 10 mg	14日	14日	16日	16日	23日	19日	28日	>30日	>30日
⁻⁵ 10 mg	16	14	16	21	30	24	28	>30	>30
⁻⁶ 10 mg	16	22	16	22	30	24	>30	>30	>30

(I) 結核菌のスミスー pH 曲線。

青山B株、朝倉株、F株及びB.C.Gのソートン培養についてスミスー pH 曲線を追及した。pHの測定には島津電氣的測定器とテストペーパー法（東洋濾紙）とを比較した結果、試料が少量で迅速に比較的正確な値を與える後者によつた。第2表のように青山B株にては培養2,3週にアルカリの山が出現し、培養進むとともにpH値は酸性側に低下しpH 5.0~5.2（標示薬Brom-Cresol-Green）又はpH 4.4~4.6（標示薬Phenol-Purple）に一定して経過した。朝倉株の変化はやゝ早く、F株及びB.C.G.では緩慢な経過をとつた。

第2表 朝倉、青山B、フランクフルト株及びB.C.Gソートン培養濾液 pH の推移

菌 株	起 始	1 週	2 週	3 週	4 週	5 週	7 週	9 週	13週
朝 倉	6.8	7.2	7.4	4.8	4.6	4.6	4.4	4.4	4.4
青 山 B	6.8	7.6	7.2	6.8	5.4	4.8	4.4	4.4	4.4
フランクフルト	6.8		7.8	7.8	7.6	7.4	7.2	7.2	4.8
B. C. G.	7.2	7.8	7.2	7.4	7.4	7.0	5.6	5.0	4.6

(Ⅲ) 培地組成變化の推移。

培地中の組成變化をしらんとし、呈色反應（ミロン反應、キサントプロテイン反應、ニンヒドリン反應、ビュレット反應、アダムキウイツ反應、デアゾ反應、坂口反應、ニーランデル反應、モーリツシュ反應）及び蛋白沈澱反應を用いた。即ち青山B株ソートン培養濾液或は濃縮液（70°～80°C及び100°C）の倍数稀釈液 0.5cc に夫々の反應試薬 0.2cc を加え陽性最高稀釈倍数をもつてしめた。モーリツシュ反應は次第に増強し 4～5 週にて最高値（160倍）に達し、ニンヒドリン反應は 3～6 週のころ一旦プラトー（10～20倍）をつくり再び減弱した。ミロン反應は 4～6 週のころ一旦最高値（20倍）をとつて減弱した。他の呈色反應は弱陽性のまゝ経過した。pH7.0に於ける硫酸安門完全飽和沈澱量、或は20%三塩化醋酸を倍量注加して析出する粗蛋白量は共に培養 1 週には陰性、2週より微量に出現し、次第に増量し、5週にて略一定値に達した。5%燐タンゲステン酸沈澱量はかゝる変動をしめさなかつた。

(Ⅳ) 結核モルモットに於ける「ツ」力價測定時期及び測定液の稀釋濃度について。

F株 0.1 mg 腹腔内感染モルモット11頭について、104°C濃縮 F株グリセリンブイヨン「ツ」及び市販傳研「ツ」の 10倍、100倍稀釈液 0.1cc の皮内反應を比較した。感染 2, 3, 5 週後の何れの「ツ」反應に於いても、両「ツ」力價の間に有意の差を認めなかつた。しかし平均比（Mean Ratio）をとつてみると、10 倍液 48 時間値にて F株「ツ」が傳研「ツ」より僅かに強いという程度であつた。次に F株グリセリンブイヨン 70°～80°C濃縮「ツ」と市販「ツ」3種の 30倍、60倍、100倍稀釈液 0.1cc の皮内反應を比較した。この場合は 104°C濃縮「ツ」の場合よりも、製法による差が強くあらわれた。殊に感染早期 12 日の皮内反應において著明であつて、37 日の皮内反應においては差を認めなくなつた。

次に旧國際聯盟法に随つて F株グリセリンブイヨン「ツ」（70°～80°C濃縮）、青山 B株ソートン「ツ」（70°～80°C濃縮）、朝倉株ソートン「ツ」（10%コロジウム膜限外濾過法にて 1/10 量に濃縮）の 500倍、1000倍、2000倍、4000倍液 0.1cc の皮内反應を検した。2000倍～4000倍の反應は極めて弱く、殊に 48 時間値が微弱であつて比較に適していない。即ち旧國際聯盟法の檢定濃度は必ずしも好適な濃度とはいえない。

(Ⅴ) 「ツ」作製時の濃縮溫度、培養日數、培地、菌体物質の吟味。

結核モルモット 12 頭の皮内反應について、青山 B株及び朝倉株「ツ」の 50倍、100倍液（0.1cc）を比較した。感染 19 日の皮内反應にては、70°～80°C濃縮「ツ」が 104°C濃縮「ツ」よりも強く、36 日の皮内反應ではこの差を認めなくなつた。但し青山 B株にては、このときも尙有意の差を認めた。朝倉株のグリセリンブイヨン及びソートン培地 30 日培養「ツ」と 50 日培養「ツ」との間に力價の差を認めなかつた。また青山 B株及び朝倉株の「ツ」Aと「ツ」Bと、また朝倉株グリセリンブイヨン「ツ」とソートン「ツ」との間に力價の差を認めなかつた。各「ツ」の呈色反應（ミロン反應、ニンヒドリン反應、モーリツシュ反應）の強さを比較したところ、皮内反應に一致して青山 B株 70°～80°C「ツ」のモーリツシュ反應は 104°C「ツ」より強く（80:40）あらわれた。又朝倉株 30 日培養と 50 日培養、青山 B株及び朝倉株「ツ」Aと「ツ」B、朝倉株ソートン「ツ」とグリセリンブイヨン「ツ」との間に呈色反應にても差を認めなかつた。即ち呈色反應と皮内反應との間に密接な關聯性の存することが窺われた。次に各「ツ」0.25cc 及び 0.1cc の結核モルモット 24 頭の致死反應を検したが、大部分の動物は 3～24 時間以内に出血性の病変を呈して死亡し、皮内反應及び呈色反應との間に並行性を確かめえなかつた。各「ツ」の三塩化醋酸沈澱蛋白量（稀釈倍数法）、その蛋白体の N量（ミクロキエルダール法）も共に呈色反應皮内反應との間に並行性を示さなかつた。さらに青山 B株「ツ」のモーリツシュ反應の相違は皮内反應 24 時間値の差と並行するが、48 時間値の差とは並行しなかつた。

この事実は次の(Ⅶ)、(Ⅷ)の結果とよく符合すると考えられる。

(Ⅵ) 「ツ」力價に及ぼす濃縮の影響。

朝倉株グリセリンブイヨン50日培養より作つた非濃縮「ツ」、「ツ」A、「ツ」Bの50倍液、100倍液0.1ccの皮内反應に於いて、「ツ」A、「ツ」B共に非濃縮「ツ」の對應濃度より強かつた。即ち濃縮操作は「ツ」容積を縮小し同時に力價を10倍以上に強くする。これは濃縮によつて粘性が大となり、溶液内の高分子物質の膠質性の変化が生じるためと考えられる。

(Ⅶ) 青山B株ソートン培養における「ツ」力價の推移と菌の發育経過との關係。

次に「ツ」組成の変化(ニンヒドリン反應、モーリツシュ反應、三塩化醋酸沈澱量を最大稀釈倍数法にて求めた)と「ツ」力價の推移との關係を検討した。「ツ」力價は結核モルモット¹⁷⁾30頭について「ツ」10倍、50倍、100倍、500倍液0.1ccの皮内反應にて測定した。第3表に示すように青山B株ソートン培養2,3週の「ツ」には多糖体は相当含まれているが、蛋白量は極めて微量であつて、皮内反應の24時間値が著明に強く、48時間値は微弱であつた。感染38日の皮内反應ではかゝる相違は目立たなくなつた。また「ツ」0.15ccの皮下注射による致死反應があらわれなかつたことは注目に値する。5,6週以後の「ツ」では蛋白量は増加し、糖質、アミノ酸は一定量に達する。

この頃培地pHは4.4~4.6に一定してきて、皮内反應は24時間値と48時間値がほぼ等しくなる。致死反應も漸次強くなる。皮内反應の24時間値は糖質と密接な關係にあつて、致死反應との關係はうすいようである。また致死反應は皮内反應48時間値と並行し、蛋白の出現と密接な關係にある。

第3表 青山B株ソートン培養における培地組成変化の推移(最大稀釈倍数)

	培養前	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	10週	13週	16週
ニンヒドリン反應	80	80	40	40	20	20	20	20	20	20	40
モーリツシュ反應	0	20	20	40	40	40	40	160	160	160	160
三塩化醋酸沈澱	0	2	16	16	20	20	20	20	20	20	40

青山B株ソートン培養における「ツ」力價の推移(a)皮内反應(傳研「ツ」の力價を1.0とす)

感 染 過 程	反 時 間	2週	3週	4週	5週	6週	7週	8週	10週	13週	16週
13日	24 ^o	0.73	0.94	1.0	1.1	1.4	1.2	1.2	1.1	1.3	1.3
	48 ^o	0.30	0.48	0.78	1.3	1.0	1.5	1.1	1.0	1.4	1.3
38日	24 ^o	0.88	0.94	1.0	1.1	1.0	1.1	0.91	1.0	1.1	1.0
	48 ^o	0.60	0.73	0.98	0.94	1.0	1.0	0.97	1.0	0.84	0.97

(b) 致死反應(0.15cc)

	2週	3週	5週	7週	10週	13週
致 死 数 供 試 数	$\frac{0}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{2}{3}$

(Ⅷ) 透析實驗による「ツ」の分析。

從來「ツ」中の多糖体は皮膚発赤因子、蛋白体は致死因子であつて、前者は非透析性、後者は透析性といわれてきた。^{3) 18) 19) 20)} 著者は青山B株ソートン3月培養濾液を10%コロジウム膜限外濾過法にて

1/4量に濃縮、5%及び10%コロヂウム膜を用いて透析した。多糖体は5%膜、10%膜をともに透析するが、蛋白体は5%膜を通過し、10%膜を通過しえなかつた。透析液及びコロヂウム囊内液0.1ccの結核モルモット皮内反応をみたところ、蛋白体を含まない10%膜透析液ではやはり24時間値が48時間値よりつよく現われ、蛋白体をふくむ5%膜透析液及び10%膜内液では48時間値が24時間値よりもむしろ増強していた(第4表)。

第4表 青山株Bソートン培養限外濾過濃縮液についての透析実験

供 試 液	10%コロヂウム膜限外濾過法にて 1/4 量に濃縮した培養濾液							
	5%コロヂウム膜				10%コロヂウム膜			
透 析 膜	残 留 液		透 析 液		残 留 液		透 析 液	
モーリツシュ 反 應	卅		卅		卅		卅	
ニンヒドリン 反 應	卅		卅		卅		卅	
ミ ロ ン 反 應	卅		卅		卅		卅	
アダムキウイツ 反 應	卅		卅		卅		卅	
三 塩 化 醋 酸 沈 澱	卅		卅		卅		卅	
結核モルモット	24 ¹⁾ 18×18	48 ¹⁾ 15×15	24 ¹⁾ 16×16	48 ¹⁾ 15×15	24 ¹⁾ 22×22	48 ¹⁾ 21×21	24 ¹⁾ 17×17	48 ¹⁾ 8×8
皮 内 反 應	21×21 11×11	20×20 20×20	18×18 10×10	16×16 15×16	23×23 32×33	18×18 34×34	15×15 16×16	8×8 11×11

(Ⅺ) 培養液の加熱時析出する核蛋白体の吟味。

「ツ」を70°～80°C又は100°Cにて加熱濃縮する時及び非加熱培養濾液を100°Cに加熱殺菌する時析出する熱凝固蛋白²¹⁾にともなつて相当量の活性物質が失われる。著者は青山B株ソートン培地100cc 9週培養非加熱濾液(pH 4.2)を100°C 30分加熱して析出した白色沈澱を濾紙上にとり、pH 4.2の醋酸水10ccにて2回洗滌し、氷室内にて乾燥(CaCl₂)、さらにエーテルにて2回洗滌、これを10% KOH液数滴にて溶解したのち蒸溜水を加えて5ccとして濾過、その無色透明な濾液に氷醋酸を加えてpH 4.2とすると再び美しい乳白色の沈澱を生じた。その遠心、上清をすて再び氷室内にて乾燥したのち秤量し4.2mgの灰白色粉末をえた。この粉末に4% NaOH液1滴滴下して溶解し、蒸溜水4.2ccを加えた。これを原液として10～1000,000倍稀釈液をつくり、その0.1ccをもつて結核モルモット皮内反応を検した。原液の化学反応としては Dische氏 Diphenylamine 核酸反応が中等度陽性、モーリツシュ反応は陰性、ペントーゼ反応として塩酸フロログルシン反応陽性、塩酸オルシン反応陽性、ケートーゼ反応としてセリワノフ反応及びフルガ反応ともに陰性、三塩化醋酸沈澱反応は中等度陽性、すなわち核蛋白体であることがわかつた。結核モルモット皮内反応は0.01～0.001 γ まで陽性であつて、24時間値と48時間値との間に差をみとめなかつた。(詳細は近く「結核」誌上に発表の予定)。

結 論

1. 青山B株ソートン培養に於いて、初期には生菌数の増加にともない菌重量も増加し、最頂期をすぎると生菌数は急激に減少してゆく。菌重量は菌体の融解のため減量してゆく。發育最高頂になつた頃培地PHは4.4～4.6に達し、この値に一定する。またモーリツシュ反応は漸次増強し、ニンヒドリン反応は減弱、ミロン反応は一旦最高頂をつくつて減弱する。蛋白量は發育初期には微量であるが後一定量になる。同時に「ツ」力價も大体一定してくる。培養早期の蛋白の殆ど含まれない「ツ」には多糖体多く、皮内反応の24時間値がつよい。致死反応は現われぬ。培養すゝんで蛋白の多くなつた「ツ」では逆に48時間値と致死反応が増強してくる。即ち多糖体は皮内反応24時間値に、また蛋白体は致死反応及び皮内反応48時間値に密接な関係を有する。

2. このことは10%コロチウム膜透析実験にて非透析性の蛋白体成分と多糖体を主成分とする透析液とにわけて結核モルモット皮内反応を検することによつても確かめられた。

3. ソートン「ツ」とグリセリンブイヨン「ツ」との間に、また菌体物質の有無によつて、「ツ」力價の差をみることはない。しかし70°~80°C濃縮「ツ」は104°C濃縮「ツ」よりも皮内反応(24時間値)がつよく、モーリツシュ反應の強さの相違と並行した。しかし致死反應、蛋白量、蛋白体N量の相違とは並行しなかつた。

4. 培養濾液加熱時及び加熱濃縮時析出する核蛋白体にとりなつて活性物質がかなり失われてゆく。

〔本研究に対しては文部省科学研究費補助を得た事を附記して謝意を表する。〕

文 献

- 1) Calmette, A et De Potter : Ann. Inst. Pasteur. T. 40, P. 353, 1926.
- 2) 柳澤謙 : 學術振興會第8小委員會報告. 昭和18年12月4日.
- 3) 渡辺義政 : 結核彙報. 2号. 73頁. 昭和15年9月.
- 4) 笹本. 村上. 柴田. 鈴木. 弘中 : 日本臨牀結核. 4卷, 10号. 653頁. 昭和18年10月.
- 5) Medlar E. M., Sasano, K. T., Caldwell D. W. and Needham, E. L. : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 43. P. 534, 1941.
- 6) Maschmann, E. und Küster, E. : Deutsch. M. W., Jg. 57, S. 143 und 1497, 1931.
- 7) Boquet, A. et Sandor, G : Ann. Inst. Pasteur, T. 57, P. 622, 1936.
- 8) Seibert, Fl. B. and Dufour : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 58, No. 3, P. 363, 1948.
- 9) Corper, H. J. and Clark, C. : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 54, Nos. 4-5, P. 401, Oct-Nov. 1946.
- 10) Jones, Wm, W., Nelson, Cl. and Dwork R. E. : Amer. Rev. Tuberc., Vol., 60, No. 1, P. 45, July, 1949.
- 11) Löweustein E.: Vorlesungen über Bakteriologie, Immunität, spezifische Diagnostik und Therapie der Tuberkulose, S. 332, 1920.
- 12) 戸田. 高木. 山田. 小林. 伊勢. 西木 : 日本臨牀, 4卷. 4号. 4頁. 昭和21年4月.
- 13) Laporte, R : C. r. Soc. Biol., T. 132, P. 420, 1939.
- 14) Seibert, Fl. B. : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 13, P. 431, 1926.
- 15) 水島治夫 : 医用統計学綱要(南江堂)昭和22年.
- 16) 白石正雄 : 近く結核誌上に発表予定.
- 17) Boquet, A. et Bretey J. : C. r. Soc. Biol, T. 113, P. 1412, 1933.
- 18) 戸田. 村田 : 東京医事新誌. 3113号, 3195頁, 昭和13年.
- 19) Seibert. Fl. B. and Long. Es, R. : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 13, P. 404, 1926.
- 20) Seibert. Fl. B. and Munday, B. : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 23, P.23, 1931.
- 21) Seibert, Fl. B. : Amer. Rev. Tuberc., Vol. 17, P. 394, 1928.